川楝素对菜青虫体内几种酶系活性的影响*

张　兴　　　赵善欢
（西北农业大学，杨陵 712100）　（华南农业大学，广州 510642）

摘要　用川楝素处理菜青虫 *Pieris rapae* L. 五龄前期幼虫，对其体内几种重要酶系的活性作了测定。结果表明，取食川楝素后的幼虫中肠组织中微粒体多功能氧化酶活性明显被抑制；蛋白酶活性也受到一定程度的抑制；对淀粉酶、脂肪酶及乙酰胆碱酯酶活性均无明显影响。酯酶总活性降低，但电泳分析结果表明亦有个别酶带得到加强。注射川楝素于血腔后，试虫中肠酯酶活性下降，但血淋巴中酯酶活性却升高，电泳图谱亦稍有不同，故有必要对酯酶同功酶作详细研究。通过测定可以看出，川楝素对菜青虫体内解毒酶系的影响可能是引致中毒的一个重要因素

关键词　菜青虫　川楝素　微粒体多功能氧化酶　酯酶　消化酶　乙酰胆碱酯酶

川楝素（Toosendanin）是一种三萜烯类物质。赵善欢和张兴（1987）对其医用及杀虫等方面的研究情况曾作过详细综述。关于川楝素杀虫作用的研究结果初步表明，其对多种农业害虫表现出一定的生物活性（赵善欢和张兴，1982；张兴和赵善欢，1983；赵善欢等，1985）。特别是对蔬菜上的主要害虫——菜青虫 *Pieris rapae* L. 从室内生物测定到田间小区试验均表现出明显的防治效果（赵善欢等，1985；张兴，1989），在应用于"无污染"蔬菜生产中的害虫防治具有广阔的前景。川楝素对昆虫的拒食作用机理已有报道（施玉樑等，1986），但对其毒杀机理还没有较系统的研究。我们曾以菜青虫幼虫为试虫，从症状学、组织学及生理生化指标等方面作了初步探讨，这里报道川楝素对菜青虫幼虫体内几种主要酶系活性的影响。

材料和方法

一、川楝素纯品（色谱纯）　由天津南开大学有机化学元素所提供。

二、试虫　从田间采回菜青虫幼虫，在室内用甘蓝叶饲养一天以上。试验时选用发育正常的五龄前期幼虫，饥饿 2—3 小时后供试。试验中均用甘蓝叶作为饲料。

三、多功能氧化酶环氧化作用测定　用定量点滴川楝素（1.75、2.5、5μg/头，对照组只点和川楝素溶液等量的丙酮溶剂）的叶碟单独饲喂试虫，吃完后记时并喂以正常饲料。定时解剖试虫制取酶液（将死亡虫体或严重昏迷而近于死亡的虫体挑出不用）。参照黄彰欣（1984）的方法进行测定，以艾氏剂转化成狄氏剂的量作为酶活性比单位（微微克分子狄氏剂/毫克蛋白/分钟）。

四、酯酶活性测定　用点滴有川楝素（3μg/片）的叶碟（对照组只用等量丙酮）饲喂试虫，选用 10 小时内吃完者参试并喂以新鲜叶片。取各组试虫（死虫挑出不用）血淋巴及中肠（清除肠内脏物）制成酶液。参照 Asperen（1962），陈巧云等（1980），刘维德等（1982—

本文于 1990 年 1 月收到。
* 本研究部分工作得到国家教委优秀年轻教师基金资助。

1983)的方法，用比色法测定酯酶总活性。以生成 α-萘酚的量作为酶活性比单位(毫克分子 α-萘酚/毫克蛋白/分钟)。 酯酶同功酶活性测定参照 Sun 等(1978)的方法做垂直平板式聚丙烯酰胺凝胶电泳。用 α-醋酸萘酯-固兰 RR 染色液染色。用透明塑料薄膜制成干板后，用岛津-CS-930 双波长薄层扫描仪在 450 毫微米处扫描。拍照扫描图，晒制成相应比例的照片，据照片绘制成图。

五、乙酰胆硷酯酶 (AChE) 活性测定 试虫处理方法同于酯酶活性测定。参照 Ellman 等 (1961)，张壬午等(1983)的方法进行测定。

六、几种水解消化酶活性测定 用定量点滴川楝素 (3μg/片) 的叶碟饲喂试虫，选用 10 小时内吃完者参试并喂以新鲜饲料。分别于取食后 24、48 小时(死虫或近于死亡者不用)用电刺激法取得肠液冷冻备用。注射组 (2.5μg/头) 于 24 小时后用电刺激法取胃液。并取各处理试虫血淋巴。每处理用试虫 50 头以上。测定参考严国光(1982)，熊学德和屈贤铭(1985)，西北农业大学(1986)，喻冲云(1987)的方法进行，本试验有所改动。蛋白酶活性测定采用 Folin-酚法 (Folin-甲液为 0.55mol/L $NaCO_3$)，测酶液水解酪素成酪氨酸的量；酶活性单位为：微克酪氨酸/毫克蛋白/分钟。α-及 β-淀粉酶总活性测定采用 3.5-二硝基水杨酸试剂测定酶液水解淀粉成麦芽糖的量；酶活性比单位为： 毫克麦芽糖/毫克蛋白/分钟。脂肪酶活性测定采用比浊法，缓冲液采用 Tris-HCl 缓冲液 (pH = 8.8±0.1)，测定酶液水解橄榄油成甘油三酯的量；酶活性比单位为：微克分子甘油三酯/毫克蛋白/分钟。

试验中酶液蛋白含量测定采用 Folin-酚法 (Lowry 等，1951)。

结 果

一、中肠中多功能氧化酶 (MFO) 环氧化作用测定结果

用不同剂量川楝素饲喂幼虫，并于饲喂后不同时间对其中肠中多功能氧化酶的环氧化活性作了测定。从测定结果(见表 1)可以看出，川楝素对该酶有明显的抑制作用，严重者可抑制活性 50% 以上。在以 1.75 微克/头的剂量处理中，取食后 48 小时的酶活性最低。随着试虫的恢复，酶活性也有所回升。在以 2.5 和 5 微克/头的剂量处理中，由于 24 小时后大多数试虫死亡，故只测了取食 15 小时后的酶活性。可以看出，随着剂量的升高，酶活

表 1 川楝素对菜青虫中肠中 MFO 活性的影响

取食川楝素后时间 (小时)	取食量 (μg/头)	狄氏剂转化量 ($\times10^{-6}$g/ml 酶液)	蛋白含量 (mg/ml 酶液)	MFO 的环氧化活性 (pmol/mg 蛋白/分钟)
15	5	0.702	6.656	27.702±2.64
15	2.5	0.686	5.826	30.028±2.44
24	1.75	0.669	5.475	32.080±2.68
48	1.75	0.443	4.409	26.403±3.51
72	1.75	0.561	3.470	42.451±4.48
至昏迷	不定	0.696	6.038	30.279±1.79
对照	—	1.557	7.284	56.144±2.13

色谱条件：柱 1.5% OV17 + 2% QF-1, Chromosorb W DMCS 80-100 目，柱温 194℃，汽化室温度 280℃，鉴定室(电子捕获)温度 250℃，氮气(99.999%)流速 45 毫升/分钟。

性有所降低。

二、乙酰胆碱酯酶（AChE）活性测定结果

用川楝素饲喂幼虫以后，对其 AChE 活性测定结果列于表2。可以看出，川楝素对该酶无明显影响。虽然在几个处理中的酶活性表现出比对照有升高或降低的现象，但不象有机磷或氨基甲酸酯杀虫剂那样可显著抑制 AChE 活性，这是值得重视的。

三、酯酶活性测定及其电泳图谱的分析

（一）比色法测定酯酶总活性

用比色法测定了川楝素对试虫血淋巴和中肠组织中酯酶总活性的影响。结果（见表2)表明，取食处理的试虫血淋巴中酯酶活性基本上无明显影响。但值得注意的是，注射组24小时后所测出的血淋巴中酯酶活性比对照组增高了 36.5％。以取食 48 小时后中肠组织的酶活性最低，比对照组下降约 40％。另外，注射川楝素于血腔中，24 小时后对中肠组织的酯酶活性仍有明显的抑制作用，比对照组下降了 28.4％。

表 2　用川楝素处理菜青虫幼虫后酯酶和 AChE 活性测定结果

处　理	酯　酶*						AChE**
	中　肠			血淋巴			OD (412nm)
	OD (600nm)	蛋白浓度 (mg/ml)	比活力	OD (600nm)	蛋白浓度 (mg/ml)	比活力 (×1000)	
取食（24 小时）	0.096	0.556	0.343	0.097	0.977	6.702	0.0966
取食（48 小时）	0.068	0.521	0.263	0.085	0.895	6.295	1.0788
取食（72 小时）	0.088	0.488	0.347	0.086	0.878	6.479	1.1041
昏迷	0.090	0.556	0.325	0.094	1.043	5.964	0.0789
注射（24 小时）	0.085	0.569	0.300	0.141	0.944	9.958	—
对照	0.146	0.689	0.419.	0.099	1.036	6.320	0.0936

* 每处理取 15 头试虫的中肠及血淋巴酶制剂进行测定(4 次测定)。
** 每处理取 25 头试虫头的酶制剂进行测定(栏中 OD 值为 6 次测定平均数)。

（二）酯酶同功酶的电泳图谱分析

从取食和注射后 24 小时试虫的酯酶同功酶聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱可以看出，处理组中肠组织主酶带（E_9、E_{13}）均被抑制，注射组被抑制的更为明显，而且 E_1、E_2、E_5、E_8 带消失(图 1C)。在取食处理中，虽然主酶带被抑制，而且 E_2、E_5、E_8 带消失，但 E_6 带却得到明显加强，在 E_1 前还出现了两条新的弱带，用 E_0 和 E_{01}（图 1A）表示。

血淋巴酯酶同功酶电泳图谱（图 2）表明，取食组同对照组几乎无明显差异，只是在 E_3—E_4 间出现了一个弱带（E_a），但 E_{10} 消失。注射组的 E_1、E_2、E_4、E_{6-7}、E_8 几个酶带均得到显著加强，同时在 E_1 前还有一条新带（E_b）。

从昏迷组中肠酯酶同功酶电泳图（3）可以看出，主酶带 E_{12} 被显著抑制，E_9、E_{10}、E_{14} 也被明显抑制。E_1、E_2、E_5、E_7、E_{13} 带消失，但 E_{3-4} 却明显得到加强，而且在 E_6 前还有一条新带（E_a）。

四、几种消化水解酶活性测定结果

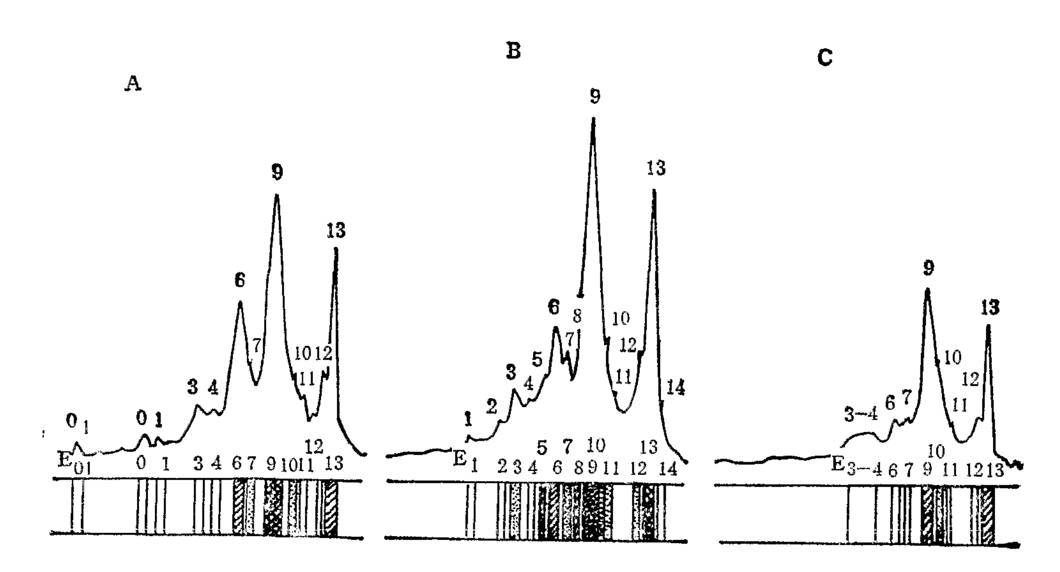


图 1 用川楝素处理菜青虫五龄幼虫的中肠酯酶电泳图谱和扫描图

A. 取食 (3μg/头)后 24 小时 B. 对照 C. 注射(2.5μg/头) 后 24 小时

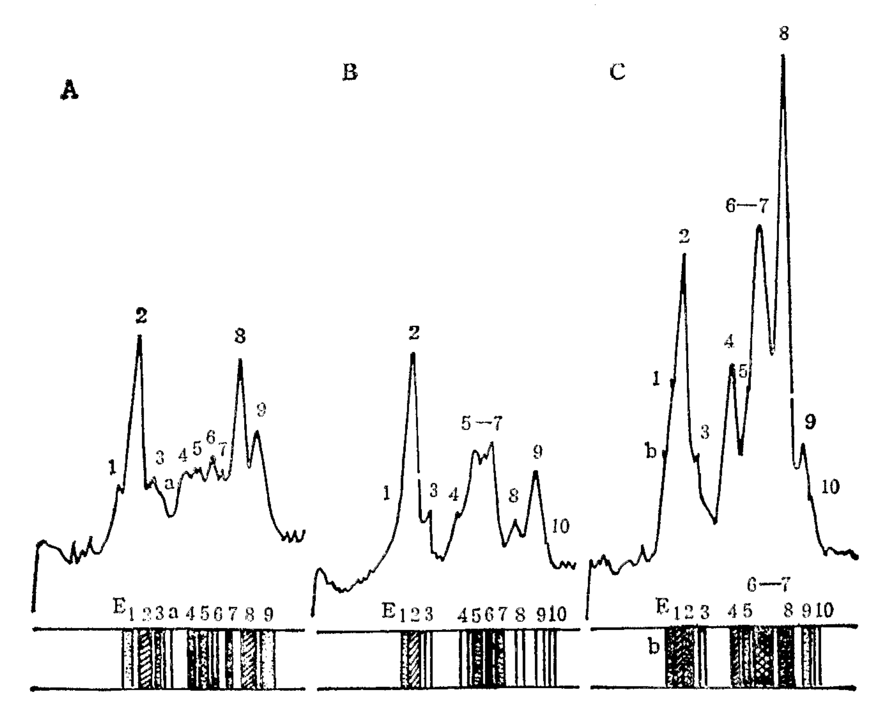


图 2 用川楝素处理菜青虫五龄幼虫的血淋巴酯酶电泳图谱和扫描图

A. 取食 (3μg/头)后 24 小时 B. 对[redacted]注射 (2.5μg/头)后 24 小时

对用川楝素处理(取食和注射)菜青虫五龄幼虫后血淋巴和肠液中的蛋白酶、淀粉酶和脂肪酶的活性作了测定后发现：用所采用的方法在血淋巴中基本上测不出上述三种酶的活性反应，肠液中几种酶活性测定结果见表3。可以看出，取食组试虫的蛋白酶活性有

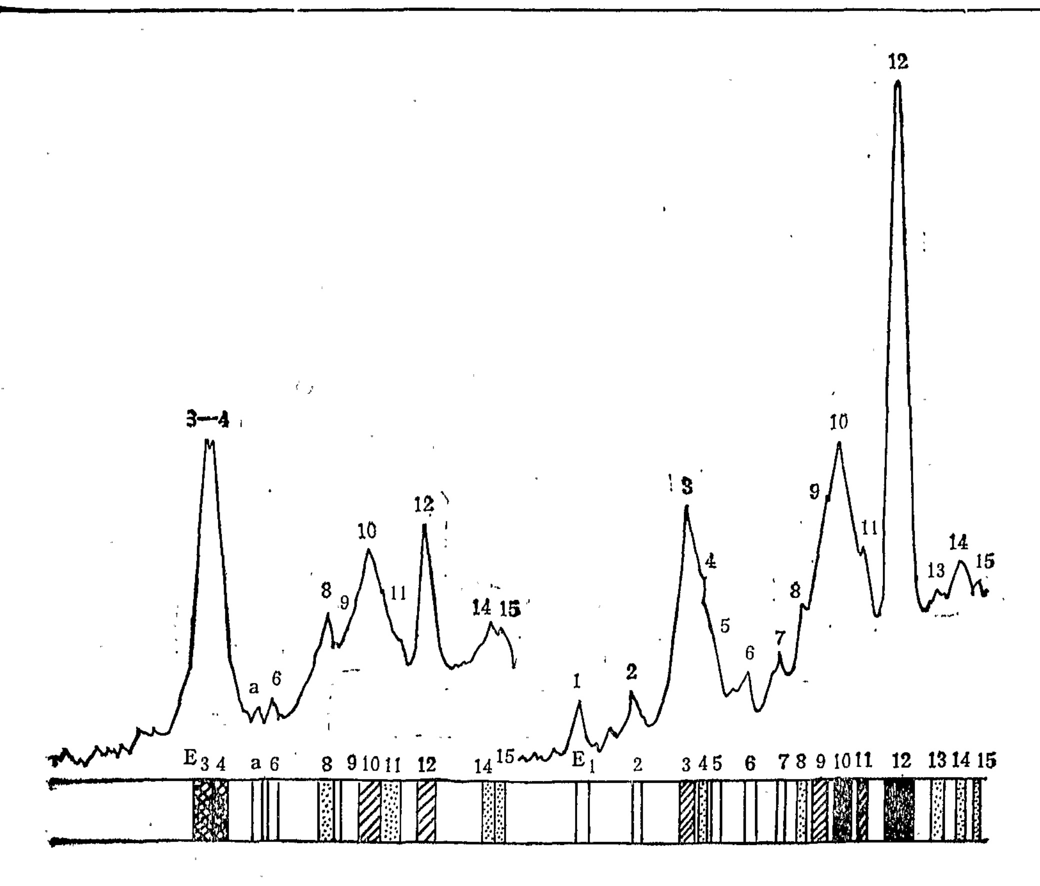


图 3　用川楝素处理而中毒昏迷的菜青虫五龄幼虫中肠酯酶电泳图谱和扫描图

A. 取食昏迷组　B. 对照组

表 3　用川楝素处理菜青虫幼虫后几种消化酶活性测定结果

处理	酶液中蛋白浓度 (mg/ml)	蛋白酶		淀粉酶		脂肪酶	
		酶液转化酪氨酸量 (mg/ml)	比活力*	酶液转化麦芽糖量 (mg/ml)	比活力**	酶液分解甘油三酯量 (μmol/ml)	比活力***
取食(24小时)	0.679	0.953	56.159	12.178	0.894	1.996	6.874
取食(48小时)	0.635	0.937	58.971	12.283	0.967	2.858	7.148
注射(24小时)	0.765	0.930	48.623	12.229	0.799	2.066	6.652
对照	0.858	1.463	68.197	16.185	0.943	2.635	6.684

* 比活力为每分钟每毫克蛋白质转化酪氨酸的微克数。
** 比活力为每分钟每毫克蛋白质转化麦芽糖的毫克数。
*** 比活力为每分钟每毫克蛋白质分解甘油三酯的微克分子数。

所降低，淀粉酶活性无明显变化，脂肪酶活性在取食48小时后测定反而有所升高。注射川楝素于试虫血淋巴（2.5μg/头）后，肠液中蛋白酶活性明显降低，淀粉酶也有所降低，而脂肪酶没有变化。

讨 论

在研究川楝素对菜青虫的致毒机理时，我们曾对菜青虫五龄幼虫肠液 pH 值作过测定。正常幼虫为 9.17，而取食川楝素后 72 小时测定为 7.82，昏迷组仅为 7.32，可见肠液 pH 值起了显著变化。在酶促反应中，介质 pH 值是一重要因素，肠液 pH 值的变化会影响消化酶的活性。在该研究中，对各处理组和对照组酶液均在统一 pH 值条件下进行测定。一般来说，消化酶的活性是比较稳定的，特别是脂肪酶活性更为稳定。如果这几种消化酶的活性变化主要是由 pH 变化而引起，那么将不同处理的酶液在同一 pH 条件下培养一定时间，其活性可能会得到一致的结果而不能测出其真正活性。故有必要在不同肠液 pH 环境下分别测取各处理组和对照组酶液的水解活性来判断川楝素对各酶系的影响。

川楝素对菜青虫幼虫酯酶活性的影响较为复杂，需继续深入研究。从酯酶总活性测定结果和酯酶同功酶电泳图谱可以看出，二者测定结果的趋势基本相同。但从电泳图谱可以看出，尽管多数酯酶同功酶被抑制，但也有少数被加强，同时还有新的酶带出现。特别是血淋巴中同功酶活性在注射川楝素后多数被明显加强。虽然在毒理学中注射法仅为一种研究手段，但这种现象是否是川楝素的诱发作用尚待深入研究。从整个测定结果来看，酯酶总活性受到明显抑制，但对酯酶同功酶的影响较为复杂，有必要对各种同功酶作进一步测定和分析。

川楝素对解毒酶系的抑制可能是引起菜青虫中毒的一个重要因素。川楝素可抑制中肠中 MFO 及酯酶总活性，虽然试验中只测定了这两种酶系活性作用中的个别反应指标，但已可以说明其正常功能受到明显影响。MFO 和酯酶是昆虫体内的两大重要解毒酶系，对分解外源毒物，维持正常生理生化活动起着重要作用。解毒酶系受到抑制后，便可延长外源毒物在体内存留时间和运输传导，并发挥其毒效而致昆虫中毒。

从整个测定结果可以看出，用川楝素处理菜青虫幼虫后，其体内的 MFO、酯酶等解毒酶系受到抑制，蛋白酶受到一定影响。试验中常可观察到畸形预蛹、畸形蛹及畸形成虫的现象有待进一步研究。我们在致毒方式研究中已证实，川楝素对昆虫无触杀，熏蒸作用只有胃毒作用，对高等动物在高剂量下(口服)也只对胃粘膜等组织有破坏作用及表现出肌无力现象(赵善欢等，1987)。本研究已证明川楝素对 AChE 无明显活性，所以对人畜无急性神经中毒可能。这些均初步表明，这一天然产物不但本身可作为一种杀虫剂，而且和其它杀虫物质混用可以发挥增效、协同作用。川楝素对害虫专一性强，对环境、天敌、人畜较为安全，将来有可能作为一种新型杀虫剂而服务于农业生产。

参 考 文 献

西北农业大学 1986 基础生物化学实验指导。16—18 页、64—66页、83—85 页。陕西科学技术出版社。
刘维德、G. P. 乔治欧 1982—1983 双硫磷诱导抗有机磷致乏库蚊酯酶活性增强的初步研究。昆虫学研究集刊 (3): 65—72。
陈巧云、姜家良、林国芳、刘维德 1980 淡色库蚊对敌百虫抗性的研究——水解酶同敌百虫抗性关系。昆虫学报 23(4): 350—7。
严国光 1982 农业仪器分析法。253—380 页。农业出版社。
张 兴 1989 几种川楝素提制品对菜青虫的生物活性。植物保护学报 16(3): 205—310。
张兴、赵善欢 1983 楝科植物对几种害虫的拒食和忌避作用。华南农学院学报 4(3): 1—7。

张壬午，吴玉霞、于维强， 1983 测定二化螟胆碱酯酶活力的快速方法。昆虫知识 20(1): 41—3。
赵善欢、张兴 1982 植物质杀虫剂对水稻三化螟的拒食及内吸毒力试验。中国农业科学(2): 55—62。
赵善欢、黄端平、张兴 1985 楝科物质对亚洲玉米螟幼虫取食和生长发育的影响。昆虫学报 28(4): 450—3。
赵善欢、张兴 1987 植物性物质川楝素的研究概况。华南农业大学学报 8(2): 57—67。
赵善欢、黄毅、彭中健、黄家总 1985 应用天然植物产品川楝素防治菜青虫试验。植物保护学报 12(2): 125—31。
施玉樑、王文萍、廖春燕、赵善欢 1986 川楝素抑制粘虫幼虫化学感受器诱发峰的观察。昆虫学报 29(3): 233—8。
黄彩欣 1984 植物性药物及增效剂对秋粘虫微粒体的氧化酶活性及其药理相关效应。华南农业大学学报 5(3): 28—38。
喻冲云 1987 生化检验单一试剂选。74—77 页。辽宁科学技术出版社。
熊学德、屈贤铭 1985 柞蚕蛋白水解酶及抑制剂的初步研究。蚕业科学11(2): 112—6。
Asperen, K. van 1962 A study of housefly esterases by means of a sensitive colorimetric method. *J. Ins. Physiol.* 8: 401—16.
Ellman, G. L., K. D. Courtney, V. Andres Jr., & R. M. Featherstone 1961 A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharm.* 7: 88—95.
Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr & R. L. Randall 1951 Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265—75.
Sun Chih-hin, Hsin Chi & Feng Hai-tung 1978 Diamondback moth resistance to Diazinon and Methomyl in Taiwan. *J. Econo. Ent.* 71(3): 551—4.

EFFECTS OF TOOSENDANIN ON SEVERAL ENZYME SYSTEMS OF THE CABBAGE WORM *PIERIS RAPAE* L.

ZHANG XING
(*Northwestern Agricultural University, Shaanxi* 712100)

CHIU SHIN-FOON
(*South-China Agricultural University, Guangzhou* 510642)

The activities of several enzyme systems of the fifth instar larvae of cabbage worm *Pieris rapae* L. treated with toosendanin, a botanical material from the bark of chinaberry (*Melia toosendan* and *M. azedarach*), were investigated. The results indicated that the activities of acetylcholinesterase, α- and β-amylase and lipase did not show obvious changes. But the activity of mixed-function oxidases in the midgut of the larvae was decreased by 50% after 48 hr feeding with toosendanin. The activities of esterases in hemolymph did not change but marked decrease was found in the midgut. Thus the detoxicification enzyme systems in the midgut was inhibited and further toxic reaction of toosendanin could take place. In addition, the activity of proteinase in midgut was also inhibited after feeding or injecting with toosendanin into the hemocoele.

Key words *Pieris rapae* L.——toosendanin——mixed-function oxidases——esterases——digestive enzyme——acetylcholinesterase